

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 03047087
PUBLICATION DATE : 28-02-91

APPLICATION DATE : 23-03-90
APPLICATION NUMBER : 02074192

APPLICANT : AJINOMOTO CO INC;

INVENTOR : KIKUCHI REIKO;

INT.CL. : C12P 21/00 A23C 9/13 A23L 1/39 A23L 2/00 C08G 69/10 C12G 3/02 // A61K
31/785 A61K 35/74 (C12P 21/00 , C12R 1:125)

TITLE : NEW GAMMA-POLYGLUTAMIC ACID, PRODUCTION THEREOF AND DRINK AGENT
CONTAINING THE SAME

ABSTRACT : PURPOSE: To enable production of γ -polyglutamic acid containing $\geq 90\%$ L-isomer and development of a drink agent consisting essentially thereof by culturing Bacillus NATTO belonging to Bacillus subtilis in a culture medium composed of specific ingredients.

CONSTITUTION: Bacillus NATTO, such as Bacillus subtilis, belonging to Bacillus subtilis is cultured in a culture medium, consisting essentially of four ingredients of an amino acid source, such as glutamic acid, a carbon source, such as glucose, an inorganic substance, such as phosphate, and biotin and containing ≤ 0.2 ppm or no manganese ions at about 30-45°C temperature. The resultant culture solution is then purified by an alcohol precipitation method, etc., to provide γ -polyglutamic acid, having $\geq 90\%$ L-glutamic acid content and 5000-1000000 average molecular weight and soluble in water. The obtained γ -polyglutamic acid as a drink agent is added to fruit juice beverages, sports drinks, etc. As a result, viscosity is imparted to the beverages to improve taste and drinkability thereof.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑥ 公開特許公報(A) 平3-47087

⑦ Int. Cl.⁸ 識別記号 庁内整理番号 ⑧ 公開 平成3年(1991)2月28日
 C 12 P 21/00 A 8214-4B
 A 23 C 9/13 8114-4B
 A 23 L 1/39 8114-4B
 2/00 F 6977-4B
 C 08 G 69/10 NRN 9053-4J
 C 12 G 3/02 8114-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

④ 発明の名称 新規ガンマー・ポリグルタミン酸、その製造方法及びこれを含む飲料用剤

⑤ 特 願 平2-74192

⑥ 出 願 平2(1990)3月23日

優先権主張 ⑦ 平1(1989)3月23日 ⑧ 日本(JP) ⑨ 特願 平1-71125

① 発 明 者 山 中 茂 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

② 発 明 者 菊 池 玲 子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

③ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
 最終頁に続く

明 細 書

(産業上の利用分野)

本発明は、食品、飲料、製菓等に關する。

(従来の技術及び問題点)

従来より、納豆菌がガンマー・ポリグルタミン酸を生産することは知られていた。また、そのポリグルタミン酸のD体とL体の比率が培地に加えるマンガンイオンの濃度、アミノ酸の種類または培養時間などで、著しく変動するという報告もいくつかある。(K.H.Ward, R.F.Anderson, F.K.Gean, Biotechnology and Bioengineering Vol. V, 41-48 (1963), 細井久雄: 農化 第37巻, 第10号, 515-518(1963)) マンガン濃度を 10^{-3} ~ 10^{-1} mol/lに变化させた所、マンガン濃度を低くするにつれL体の含量が増加する傾向があった。この方法では、生体系に多いL体の比率は最大80%程度までしか達していず、L体の比率がこれ以上高含有のものは知られていなかった。

(発明が解決しようとする課題)

L体を80%以上含有するガンマー・ポリグルタミン酸の開発及び該ガンマー・ポリグルタミン酸

1. 発明の名称

新規ガンマー・ポリグルタミン酸、その製造方法及びこれを含む飲料用剤

2. 特許請求の範囲

(1) 構成アミノ酸がグルタミン酸であり、全グルタミン酸中のL-グルタミン酸含有率が90%以上であり、平均分子量が5千~100万である新規ガンマー・ポリグルタミン酸。

(2) アミノ酸を基質とし、少なくとも炭素源、無機質、及びビオチンを必須成分とし、マンガンイオンを含まないか又は0.2 ppm以下を含む培地でバチルス・ズブテリスに属する納豆菌より産生されることを特徴とする、請求項(1)記載の新規ガンマー・ポリグルタミン酸の製造方法。

(3) 請求項(1)記載の新規ガンマー・ポリグルタミン酸またはその塩を含むことを特徴とする飲料用剤。

3. 発明の詳細な説明

の製造方法を開発することにある。

(課題を解決するための手段)

上記の問題を解決すべく鋭意研究した結果、バチルス・スプテリスに属する納豆菌(微生物発酵株 FERM P-10807)が産生するし体を90%以上含有するガンマー・ポリグルタミン酸及びその製造方法さらに当該ガンマー・ポリグルタミン酸を主成分とする飲料用剤を開発することにより本発明を完成させた。さらに本発明を詳述する。

すなわち本発明は、構成アミノ酸がグルタミン酸であり、全グルタミン酸中のL-グルタミン酸含有率が90%以上であり、平均分子量が5千~100万である新規ガンマー・ポリグルタミン酸、その製造方法、及びこれを含む飲料用剤である。

本発明の新規ガンマー・ポリグルタミン酸は、構成アミノ酸がグルタミン酸であり、全グルタミン酸中のL-割合含有率が90%以上であり、比旋光度 $[\alpha]_{D}^{25} = +192^{\circ} \sim +241^{\circ}$ であり、酸性下(pH 2.0)でも沈澱せず、平均分子量が5千~100万であり、ニンヒドリン反応、ビウレット反応、アンス

ロン反応、モリッシュ反応及びエルゾーモルガン反応に陰性を示し、水に可溶であり、硫酸アンモニウム、トリクロロ酢酸により沈澱せず、メタノール、エタノール、硫酸銅、酢酸バリウム、アセトン及びリパノールにより沈澱し、その水溶液を熱処理(120℃, 20分)しても沈澱を生じず、波長下で1530 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} にそれぞれ特性赤外線吸収スペクトルを示す性質を有する。

本発明における納豆菌とは、バチルス・スプテリス、バチルス・リッチエニフォルミス、バチルス・ノガテリウム、バチルス・メッセンテリガス、及びバチルス・フントラシル等ポリグルタミン酸を主成分とする粘質物を産生するバチルス属細菌を指す。

本発明の新規ガンマー・ポリグルタミン酸の産生に用いる培地は、グルタミン酸、プロリンまたはアラニン等の単位のアミノ酸、その塩、これらの混合物または大豆・小豆等より得られるアミノ酸を含む抽出物をアミノ酸源とし、グルコース、

グリセリン、マルトース、シュクロース、フラクトース、ビルビン酸ナトリウム、これらの混合物または植物・微生物・動物等より得られる炭水化物を含む抽出物等を炭水化物とし、リン酸塩、マグネシウム塩、鉄塩、カリウム塩または塩化ナトリウム等を無機質とし及び、ビオチンの四成分を必須成分とする。マンガンイオンは、通常の培地中に添加する量では、本発明の新規ガンマー・ポリグルタミン酸の産生には不適当であり、本発明では全く含まないか又は0.2 ppm以下に制限することを得る。

培養温度は30~45℃、培養日数は2~15日、振盪・静置のどちらでも可能であるが、収率の点から、34~40℃、3~7日、振盪の条件が望ましい。

精製方法は主に二方法、すなわち膜濾法による沈澱法(Throne, S.C., C.G. Gomez, R.E. Houes and R.O. Houesvriant, J. Bacteriol., 68, 307(1954))、及びアルコール沈澱法(上記, R.M. Ward, R.F. Anderson and F.K. Dean; Biotechnology and Bio-

engineering, 5, 41(1963)、沢田忠、村川政雄、村尾寛夫、大井正次郎; 農化, 第47巻, 第3号, 159~165, (1973))等が知られており、どちらでも純度95%以上の製品が得られたが、飲料用剤として用いる場合は後者の方が望ましい。具体例に示すならば、培養液に飽和食塩水を10%(v/v)添加し、98%エタノールにガラス棒で攪拌しながら添加し、沈澱物を掻き取り、これを3%食塩水に溶解させ、濾心により不溶物を除去し、上澄みを一昼夜透析する。これで得られた透析内液がポリグルタミン酸の水溶液であり、以後、エタノール沈澱と透析を繰り返すことにより純化を進め、最後に凍結乾燥により精製ポリグルタミン酸を得る。

本発明でいう飲料用剤とは、果汁飲料、スポーツドリンク、乳製品(含むヨーグルト)等の清涼飲料水、アルコール飲料またはスープ等に添加するものである。飲料用剤の形状はポリグルタミン酸またはその塩、及びこれらと培養に由来する副産物との混合物を凍結乾燥などの処理によって得

られる粉末、または粉末を湿式または乾式造粒した顆粒状、粉末または顆粒状粉末をそのまま、または製剤剤その他を加えて一定の形状に圧縮した錠剤、または、該粉末を水等の溶媒に溶解させて得る溶液、またはゲル等である。ポリグルタミン酸を飲料用剤として飲料に添加(1×10⁻³%〜5%)すると従来の飲料にはない、酸味、口当りの良さが得られる。またポリグルタミン酸は水溶性であるため、食物繊維と云っても、摂取後腸壁のずらぐらした舌に残るような不快感もなく、また発酵による不愉快性もない。

また添加することにより、飲料の酸味が抑えられ、味がまろやかになるという効果もわかった。

本発明において、飲料用剤としてポリグルタミン酸を用いるに際して飲料用剤調製時に用いられる他の高分子物質と併用することに制限はない。

また他の成分分子化合物あるいは無機化合物、香料、調味料または保存剤等と組み合わせることも及び各種糖類と組み合わせることもについても何ら制限はない。

$\text{NaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ は、0.0.1. 0.8 mg/lの三段階にした、天然酵母リスターニングしてまたパチルス・スプテリス(バーヂェスマニエール第9版により同定)後工研寄託(後工研寄託 FERM P-10507)を培地A上で1日、30℃にて前培養した。これを生理食塩水にて0.8=0.7(570 na)になるよう経濃させ、培地Bにて0.6 ml/diずつ接種した。培養は40℃、7日間、120回/分の振盪にて行った。培養液は、10%の食塩水、及び二倍量のエタノールを加え、沈澱物を取り、80%のエタノールで脱水し、小さな断片にし、真空中にてエタノール除去をした。これを3%食塩水に懸濁後、23,000 gにて遠心し、その上澄みを一昼夜透析した。透析したサンプルは、同様にしてエタノールにより回収した。この過程を一回繰り返す。最後に透析内液を凍結乾燥させることにより、純度95%以上の純白製品を得た。本製品を8規定の塩酸中で100℃、6時間加水分解し、50℃でエバポレーションヘッドを用いて塩酸を除去し、水に再溶解させてからD12アミノ酸分析用カラム(HCI GEL CRS10V)を用い

本発明の飲料用剤にフラグランを含む多糖が含まれていても良い。

ガンマー・ポリグルタミン酸を飲料用剤に加工した後、飲料に添加するについては、そのまま加えてもまた溶解を容易にさせるために水等の溶媒に溶解させてから添加しても良い。

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

実施例1〜3

培地A…肉汁察天培地

培地B

グルコース	5 %
シーグルタミン酸ナトリウム	1.5 %
KH_2PO_4	0.27 %
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.42 %
NaCl	0.05 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 %
ビオチン	100 μ

99 7.4

た液体クロマトグラフィーにて、D-及びL-グルタミン酸の定量を行った。結果を表1に示す。 $\text{NaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が0〜0.1 mg/lの範囲でし体の比率が、95%以上、0.8 mg/lで約80%というし体含有率の高いガンマー・ポリグルタミン酸ナトリウムを得た。

比較例1及び2

実施例1において $\text{NaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を8及び20 mg/l用いた以外は同様にした。結果を表1に示した。

表1

実施例	1 2 3	$\text{NaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 濃度(mg/l)	Na^+ (ppm)	ポリグルタミン酸中のし体の比率(%)
		0 0.1 0.8	5 0.025 0.2	95.1 95.2 91.3
比較例	1 2	4 20	1.6 5	82.4 72.3

実施例4

実施例1で得たし体含有率が95.1%のポリグルタミン酸ナトリウム酸類乾燥物10gと等量のメチルセルロースを混合液中に均一に混合し、溶液を攪拌し、5.0%メチルアルコール(メチルセルロースの20倍)を加え、さらに混合した。これをスクリーン押出し装置で乾燥、造粒及びふるいの工程を経てポリグルタミン酸ナトリウムの顆粒10.5gを得た。

実施例5

実施例3で得たし体含有率が1.3%のポリグルタミン酸ナトリウム5gにアスパルテーム原末を加え以下実施例4と同様にして、アスパルテーム含有のポリグルタミン酸ナトリウム顆粒5.6gを得た。

実施例6

実施例4で得られたポリグルタミン酸ナトリウム顆粒5g及び、賦形剤としてメチルセルロースを更に加え、半量式打錠機で、ポリグルタミン酸ナトリウムの錠剤5粒を得た。

ここで得られた果汁飲料をポリグルタミン酸類乾燥物を添加しない該飲料をコントロールとして、20人のパネラーにより官能テストを試みた。項目は、粘性、口当たりの良さ、酸味及び飲みやすさであった。テストの結果は、表4に示す。

実施例7

実施例2と同様にして得たし体含有率が6.3%のポリグルタミン酸ナトリウム1gを3gの割合で水に溶解させた。得られた半量式打錠機はレトルトパックに入れ加圧高温殺菌をして保存した。殺菌及び保存中(常温5ヶ月)のポリグルタミン酸の性状は見られなかった。

実施例8

実施例4で得たポリグルタミン酸類乾燥物を用いて下記成分表に示した果汁飲料(レモネード)を試作し該飲料の改質を試みた。混合比は表3の通りである。

表 3

成分名	混合比
レモンジュース	3.6g
シュガーシロップ	7.2g
水	2.7g
ポリグルタミン酸類乾燥物	3.0g

実施例9

実施例2と同様にして得たし体含有率が9.8%のポリグルタミン酸類乾燥物2gを市販のスポーツドリンク(アムネン2)に0.1g添加した。コントロールとしてポリグルタミン酸類乾燥物のスポーツドリンク(アムネン2)を用いて、20人のパネラーにより官能テストを行った。項目は粘性、口当たりの良さ、酸味であった。テストの結果は、表4に示す。

実施例8、9の結果(△：上がった、○：どちらともいえない、□：下がった)

表 4

評価	粘 性			口 当 り の 良 さ			酸 味			飲 み や す さ		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
実施例8	18	2	0	13	5	3	1	4	15	13	5	2
9	19	1	0	13	4	3	1	3	16	—	—	—

表4のように、ポリグルタミン酸ナトリウム、その顆粒物、またはポリグルタミン酸ナトリウムの混合物の顆粒物を飲料に添加することにより飲

比較例 3

比較例 2 で得たしほ含有率 72.3 % のガンマー・ポリグルタミン酸ナトリウムを用い、実施例 1 に準じて沈澱物の量を測定した。結果を併せて表 6 に示した。

表 6

	しほの含有率(%)	沈澱物の乾燥重量(mg)
実施例 11	95.1 %	0
比較例 3	72.3 %	10.5

〔発明の効果〕

解豆面により本発明の全グルタミン酸中のシ－グルタミン酸含有率が 90 % 以上である新規ガンマー・グルタミン酸とその製造方法を開発した。本発明の新規ガンマー・ポリグルタミン酸は、酸性下でも沈澱しないため、酸性条件にして沈澱物を取り除く事が出来、また酸性条件でも透明の水溶液が得られた。本発明の新規ガンマー・ポリグルタミン酸を用いることにより、加える飲料に粘性を付与し、口当たり及び飲みやすさを改良し、微味を抑える効果を有し、かつ、一般に受け入れやすいポリグルタミン酸を主成分とする飲料用剤を開発することができた。

特許出願人 味の素株式会社

第 1 頁の続き

©Int. Cl.⁸ 識別記号 庁内整理番号
 // A 61 K 31/785 ACR S 7431-4C
 25/74 8615-4C
 (C 12 P 21/00
 C 12 R 1:125)